

DOCKET NO.: 212833 US

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: MAEKAWA Takami et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/JP00/00902

INTERNATIONAL FILING DATE: February 17, 2000

FOR: METHOD FOR ANALYZING EXPRESSION FREQUENCIES OF GENES

REQUEST FOR CONSIDERATION OF DOCUMENTS
CITED IN INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Assistant Commissioner for Patents

Washington, D.C. 20231

Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that applicant(s) request that the Examiner consider the documents cited in the International Search Report according to MPEP §609 and so indicate by a statement in the first Office Action that the information has been considered. When the Form PCT/DO/EO/903 indicates both the search report and copies of the documents are present in the national stage file, there is no requirement for the applicant(s) to submit them (1156 O.G. 91 November 23, 1993).

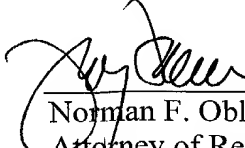
Respectfully submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



22850

(703) 413-3000
Fax No. (703) 413-2220
(OSMMN 1/97)

 WILLIAM E. BEAUMONT
REGISTRATION NUMBER 30,996
Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
Surinder Sachar
Registration No. 34,423

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TOYAMA, Tsutomu
Yokoyama Building, 6th Floor
4-10, Higashi Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0004
JAPON

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 20 April 2000 (20.04.00)	IMPORTANT NOTIFICATION
Applicant's or agent's file reference B-583AYOP962	
International application No. PCT/JP00/00902	
International publication date (day/month/year) Not yet published	
Applicant AJINOMOTO CO., INC. et al	International filing date (day/month/year) 17 February 2000 (17.02.00) Priority date (day/month/year) 17 February 1999 (17.02.99)

1. The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
3. An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
4. The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
17 Febr 1999 (17.02.99)	11/38538	JP	07 April 2000 (07.04.00)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Marc Salzman

Telephone No. (41-22) 338.83.38

003242323

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

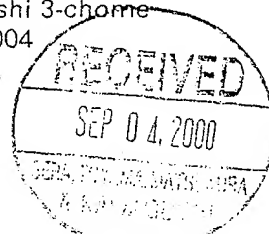
NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TOYAMA, Tsutomu
Yokoyama Building, 6th Floor
4-10, Higashi Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0004
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 24 August 2000 (24.08.00)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference B-583AYOP962			
International application No. PCT/JP00/00902	International filing date (day/month/year) 17 February 2000 (17.02.00)	Priority date (day/month/year) 17 February 1999 (17.02.99)	
Applicant AJINOMOTO CO., INC. et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
EP

The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 24 August 2000 (24.08.00) under No. WO 00/49143

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 C12N 15/10, C12Q 1/68	A1	(11) 国際公開番号 WO00/49143 (43) 国際公開日 2000年8月24日(24.08.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/00902 (22) 国際出願日 2000年2月17日(17.02.00) (30) 優先権データ 特願平11/38538 1999年2月17日(17.02.99) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 味の素株式会社(AJINOMOTO CO., INC.)[JP/J] 〒104-0031 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 前川 蒼実(MAEKAWA, Takami)[JP/J] 伊達雅代(ITE, Masayo)[JP/J] 福田尚夫(FUKUDA, Hisao)[JP/J] 高原義之(TAKAHARA, Yoshiyuki)[JP/J] 〒210-0801 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 中央研究所内 Kanagawa, (JP) 三井 彰(MITSUI, Akira)[JP/J] 〒210-0801 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 医薬研究所内 Kanagawa, (JP)		(74) 代理人 遠山 勉, 外(TOYAMA, Tsutomu et al.) 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: METHOD FOR ANALYZING GENE EXPRESSION FREQUENCY (54)発明の名称 遺伝子の発現頻度の解析方法 (57) Abstract A method for analyzing gene expression frequency which comprises constructing a vector primer having a cDNA bonded thereto by synthesizing the cDNA from mRNA with the use of a vector primer having a poly(T) sequence; tagging the cDNA sequence on the vector primer; linking the thus obtained tag via a sequence capable of recognizing the tag terminal to thereby form a concatemer; and then analyzing the base sequence of this concatemer.		

遺伝子発現頻度解析において、ポリ T 配列を有するベクタープライマーを用いて mRNA から cDNA を合成して cDNA が結合したベクタープライマーを生成し、同ベクタープライマー上で cDNA 配列をタグ化し、得られたタグを、タグの末端が識別できるような配列を介在させて連結することによりコンカテマーを形成させ、このコンカテマーの塩基配列を解析する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CU	キューバ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
DE	ドイツ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DK	デンマーク	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
		KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

遺伝子の発現頻度の解析方法

技術分野

本発明は、遺伝子の発現頻度の解析方法に関し、詳しくは、遺伝子発現の動的変化を捉えるために、細胞において蛋白質をコードする全遺伝子より発現しているmRNAの種類と量を、微量生体サンプルを用いて解析することが可能な方法に関する。

背景技術

ゲノム上に存在する蛋白質をコードする遺伝子の総数は、ヒトで約10万種と予想されている。既に全ゲノム構造が明らかとなった酵母では、蛋白質をコードする遺伝子の総数は約5000種と推定されている。

近年、公共の遺伝子データバンクが欧米、日本を中心に設立され、世界中の膨大な量の遺伝子情報がデータバンクに登録されており、さらに日々新たな情報がデータバンクに集まって来る。世界規模で行なわれているヒトゲノムプロジェクト (human genome project) は、2005年を目標にヒトゲノムの全遺伝子の配列を明らかにしつつあり、その遺伝子情報もデータバンクに登録されつつある。ある遺伝子配列についてデータバンクに問い合わせると、その配列と同一又は類似の配列を持つ遺伝子が既に登録されているか否か、さらには登録されていれば、その配列に関する情報、例えば、遺伝子名、機能、関連する文献等を知ることができる。このような検索をホモロジー検索といい、ホモロジー検索を行うソフトウェアは何種類かあるが、多数の検索を行なう場合は検索時間の短いBLASTが通常用いられている。

通常、細胞の遺伝子は全ての遺伝子がmRNAに読みとられ、mRNAから蛋白質が生産されている訳ではなく、ヒトでは1細胞の発現している遺伝子は約15000種と推定されている。このように、細胞中では何種類ものゲノム遺伝子が発現しており、それに応じた種類のメッセンジャーRNA(以下、「mRNA」という)が生成して

いるが、発現している遺伝子の種類及び量(以下、「遺伝子発現頻度情報」ともいう)は、細胞の種類、状態により変動する。例えば、血液幹細胞からリンパ球前駆細胞、プレB細胞、B細胞、活性化B細胞と分化するに従い、各細胞で共通に発現する遺伝子もあるが、全く違う遺伝子発現を示す。

上記のような遺伝子発現頻度情報を測定することを、遺伝子発現プロファイル解析という。細胞の生命活動を担っているのは主として蛋白質であり、mRNAから翻訳される蛋白質の種類と量を解析することは、遺伝子発現解析として重要であるが、現状では全蛋白質のプロファイルを得ることは技術的に困難である。一方、mRNAについては、全種類のmRNAを測定することが可能となっている。

遺伝子発現プロファイル解析法として最初に報告されたのは、Body Map法 (Gene, 174, 151-158 (1996)) である。Body Map法の概略は以下の通りである。ベクター上のポリ T 配列と mRNA の 3' 末端にあるポリ A テールを結合させ、ベクターポリ T 配列をプライマーとして cDNA を合成する。更に、制限酵素 MboI で cDNA を切断する。MboI サイトは cDNA 上で平均 300 塩基対に一つあるため、ベクター上の cDNA は平均 300 塩基対に分断される。このとき、最もポリ A テールよりの cDNA は、ベクターに結合したまま残る。この cDNA 断片を持つベクターを閉環させ、それを大腸菌に導入して cDNA ライブラリーを作製する。ライブラリーから約 1000 クローンを選択して、それぞれについて平均 300 塩基対の塩基配列を決定する。それらの配列の中から同じ配列を含むクローン毎にまとめて、それぞれの配列の種類と出現頻度を算出して遺伝子発現プロファイルを得る。各 cDNA 配列はデータベースでのホモロジー検索 (BLAST 検索) を行い、既知の遺伝子と同一の配列を有するクローンにはその遺伝子の名称を与える。配列がデータベースに登録されていない場合は、その配列に該当する遺伝子は存在しないものとする。

BLAST 検索によりホモロジー検索を行なうためには、最低 11 塩基対の情報が必要である。10 塩基からなる配列の種類は約百万種であり、人で存在すると予想される遺伝子の種類 10 万種を遙かに越える。すなわち、11 塩基対の情報があれば、その配列を持つ遺伝子は特定することができ、遺伝子発現プロファイル解析が可能である。したがって、多量のシーケンスを必要とする Body Map による遺伝子発現プロファイル解析を効率化するために、Body Map における約 300 塩基対の cDN

A断片を、更に11塩基対以上の短い断片(「タグ(tag)」と呼ばれる)とし、更にこの断片同士を多数連結してベクターに挿入することにより、連結タグのライブラリーを作成し、Body Mapと同様に約1000クローンを任意に選択して、連結タグのDNA配列を決定すれば、Body Mapと同じ手数でより多くの遺伝子発現情報を得ることが期待できる。タグは遺伝子配列を代表し、タグの出現頻度はその遺伝子の発現頻度を現す。通常、1回のシーケンスで判読出来るDNA配列の長さは約600塩基対であるから、1回のシーケンスで最大50個程度のタグのDNA配列を判読出来る。すなわち、Body Map法に比べて最大約50倍の効率で、遺伝子発現プロフィール解析を行うことが可能になる。

上記の考えに基づいた遺伝子発現プロフィール解析法として、Serial analysis of gene expression (SAGE) 法がある(米国特許第5,695,937号、第5,866,330号、欧州特許公開第0761 822号)。SAGEは、ビオチンが3'末端に結合したポリTをプライマーとしてcDNAを作製し、Body Mapと同様にMboI等の制限酵素(「アンカリング酵素(anchoring enzyme)」と呼ばれる)でcDNAを切断した後、ビオチンが結合した3'末端を含むcDNA断片をアビジンビーズに吸着させ、ビーズを二分して、それぞれのビーズに吸着したcDNA断片(約13bp)に2種のリンカー(A又はB)の一方ずつを結合させる。各リンカーにはBsmFIのようなClass II制限酵素(「タグ化酵素(tagging enzyme)」と呼ばれる)のサイトを含ませておく。タグ化酵素でcDNA断片をビーズから切り出し、切断部位を平滑化し、Aリンカーに接続するタグとBリンカーに接続するタグを連結させる。これは、ダイタグ(ditag)と称される。AリンカーとBリンカーを認識するプライマーを用いてPCRによりダイタグを増幅する。増幅されたダイタグ同士を多数連結させてベクターに組み込み、シーケンスする。1シーケンスで最大50程度のタグシーケンスを得ることができる。このタグシーケンス情報を集計して、遺伝子発現頻度を導き出す。

また、遺伝子の発現頻度を解析する他の方法として、遺伝子チップ法及び遺伝子マイクロアレイ法がある。いずれも、遺伝子断片を適当な板の上(通常はスライドガラス)に、極めて高密度に(約10個/mm²以上)並べて張り付けたものが用いられる。このチップと蛍光ラベルしたmRNAをハイブリダイズさせて、mRNAの種

類と量を測定する。

上記のように、遺伝子の発現頻度を解析する方法がいくつか開発され、それなりの成果は得られている。現状では、全ての真核生物の全ての遺伝子の発現頻度を測定するにはSAGE法が最も有効な手段であるが、実際にこの手法を実施しようとすると多くの問題に遭遇して、殆どの研究機関でSAGE法を再現することができなかった。すなわち、SAGE法は、手技が難しく、特別に訓練した者しか実施できない。また、測定にはmRNAが1 μ g程度必要であり、少量の検体しか入手できない場合、例えば臨床生検材料では測定を行うことや、組織の微細な部分の遺伝子発現の違いを測定することは、事実上不可能である。さらに、原理的に測定ミスが多い。

SAGE法では、正確にタグの配列を読み取ることは極めて重要である。なぜなら、タグは短く（約13bp）、一カ所でも読み間違いがあると同一物であるにも関わらず別物と判断したり、また、異なるタグを同一物とみなしてしまうことが起こる。ところが、SAGE法にはこの間違いが生じる可能性が高い。なぜなら、SAGE法では2つのタグをつなげてダイタグを形成するが、このときにタグとタグの境界が不明瞭になるからである。タグはBsmFIやFokIなどの制限酵素で切り取られる短い遺伝子断片である。しかし、これらの酵素は切断部位が必ずしも安定しておらず、切り出されたタグの長さはまちまちである。このように長さの異なるタグが混在している状態でタグとタグをつなげてダイタグにすると、タグとタグの連結部位の塩基は、もともとどちらのタグ由来のものなのか判らなくなる。その結果、正確なタグの配列が得られなくなる。このように、SAGE法には原理的に不可避な欠点がある。また、SAGE法にはアビジン及びビオチンビーズを用いてDNAを回収する操作があるが、アビジン及びビオチンビーズを用いてコンタミネーションを生じることなくDNAを回収することは実際には非常に難しく、プロトコール通りの操作では正確なデータを得ることは非常に困難である。また、SAGE法ではデータを得るためには多量のmRNAを必要とし、臨床サンプルなどのサンプル量に限りがあるものの場合、十分なmRNAは得られず、SAGE法は実施困難であった。

また、遺伝子チップ法及び遺伝子マイクロアレイ法では、Body Map法やSAGE法と違って、構造の解っている遺伝子しか測定することができない。したがって、

現状では、全ての生物の全ての遺伝子の発現頻度を測定することはできない。

現状では、全ての真核生物の全ての遺伝子の発現頻度を測定するにはSAGE法が最も有効な手段であるが、実際にこの手法を実施しようとする多くの問題に遭遇して、殆どの研究機関でSAGE法を再現することができなかった。SAGE法の問題点を上げると、(1)手技が難しく、特別に訓練した者しか実施出来ない。(2)測定にmRNA量が1 μ g程度必要であり、小量の検体しか入手できない場合、例えば臨床生検材料は測定できない。同様に、組織の微細な部分の遺伝子発現の違いを測定することができない。(3)ダイタグを測定するために、原理的に測定ミスが多い。

発明の開示

本発明は、上記現状に鑑みなされたものであり、通常の研究者が容易に実施することができ、また、ごく微量の検体から正確な遺伝子発現頻度解析を行なうことができる方法を提供することを課題とする。

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、ポリT配列を有するベクタープライマーを用いてmRNAからcDNAを合成し、同ベクター上でcDNA配列をタグ化し、得られたタグを、タグの末端が識別できるような配列を介在させて連結することによりコンカテマーを形成させ、このコンカテマーの塩基配列を解析することによって、効率よく、しかも高精度で遺伝子の発現頻度を解析することができることを見出し、「MAGE (Micro-analysis of Gene Expression)」と名付けた本発明の方法を完成するに至った。

すなわち本発明は、以下のものを提供する。

(1)以下のステップを含む遺伝子の発現頻度を解析する方法；

(a)直鎖状のプラスミドベクターの一方の3'末端に一本鎖のポリT配列と、その内側に第一の制限酵素認識配列とを有し、他方の末端近傍に第二の制限酵素認識配列と、さらにその内側にタイプIIS制限酵素認識配列とを有するベクタープライマーと、遺伝子の発現頻度を解析しようとする細胞に由来するmRNAとをアニールさせてcDNA合成を行い、cDNAが結合したベクタープライマーを生成するステップと、

(b) 前記 cDNA が結合したベクタープライマーを、ベクタープライマーを切断せず、かつ、前記第二の制限酵素の切断末端と同じ形の末端を生じさせる第三の制限酵素と、前記第二の制限酵素とを用いて消化して cDNA の上流側を切除し、ベクタープライマーを閉環するステップと、

(c) 閉環したベクタープライマーを、前記第一の制限酵素及び前記タイプ II S 制限酵素で消化して、cDNA の一部からなるタグを残して cDNA の下流側を切除し、ベクタープライマーを再び閉環するステップと、

(d) 前記ベクタープライマーを鋳型とし、ベクタープライマー中のタグの両側のそれぞれの領域に相当する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてポリメラーゼ・チェーン・リアクション (PCR) を行い、タグを増幅するステップと、

(e) 前記増幅産物を連結してタグのコンカテマーを形成するステップと、

(f) 前記コンカテマーの塩基配列を決定し、その塩基配列中に出現するタグの種類及びその頻度を調べるステップ。

(2) 前記ステップ (e) において、連結反応を、一方の末端がタグの末端と同じ形を有するアダプター存在下で行い、それによりコンカテマーの両端にアダプターを配置させ、アダプターの配列に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーに用いて PCR を行うことによりコンカテマーを増幅することを特徴とする (1) の方法。

(3) 前記ステップ (e) の後に、前記コンカテマーの塩基配列の決定を、塩基配列決定用のクローニングベクターにクローニングして行うことを特徴とする (1) 又は (2) の方法。

(4) 前記第三の制限酵素の認識配列が 4 塩基である (1) ~ (3) のいずれかの方法。

(5) ベクタープライマーは、第二の制限酵素認識配列の切断点と同じ位置又はその内側に切断点を有し、かつ、タイプ II S 制限酵素による切断によってベクタープライマーから切除されない第四の制限酵素認識配列を有し、

前記 (d) のステップで用いるプライマーのうち、タグの下流側のプライマーは、第四の制限酵素切断末端と同じ形の末端を生じさせる第五の制限酵素の認識

配列を有し、増幅されたプライマーを第四の制限酵素及び第五の制限酵素で消化した後にコンカテマーを形成させる（１）～（４）のいずれか一項に記載の方法。

（６）前記ベクタープライマーは、第一の制限酵素認識配列のさらに内側に第五の制限酵素認識配列と一塩基異なる塩基配列を有し、前記タグの下流側のプライマーを用いたPCRにより前記一塩基異なる塩基配列が第五の制限酵素認識配列に変換される（５）の方法。

（７）前記第三の制限酵素、第四の制限酵素及び第五の制限酵素が同一である前記（６）の方法。

（８）ベクタープライマーが、マルチクローニング部位を有するプラスミドを同マルチクローニング部位の二箇所で切断して得られる直鎖状プラスミドと、この直鎖状プラスミドの一方の末端と同じ形の末端を有し、一本鎖のポリT配列を有する部分二本鎖DNAとが連結されたものである（１）～（７）のいずれかの方法。

図面の簡単な説明

図１は、ベクタープライマーを作るためのプラスミドDNAの構造の一例（MAGE/pUC19）を示す。

図２は、ベクタープライマーの構造の一例とその構築過程を示す。

図３は、本発明の方法のステップ（a）及び（b）を模式的に表す。

図４は、本発明の方法のステップ（c）及び（d）を模式的に表す。

図５は、本発明の方法のステップ（e）と、ステップ（e）により得られる増幅産物をシーケンス用クローニングベクターに挿入するステップを模式的に表す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の方法は、上記（a）～（f）のステップを含む。以下、各ステップ毎に説明する。

<1>ステップ（a）

最初のステップでは、直鎖状のプラスミドベクターの一方の3'末端に一本鎖

のポリ T 配列と、その内側に第一の制限酵素認識配列とを有し、他方の末端近傍に第二の制限酵素認識配列と、さらにその内側にタイプ IIS 制限酵素認識配列とを有するベクタープライマー（以下、「逆転写用ベクタープライマー」ともいう）を用いる。ここで、タイプ IIS 制限酵素とは、制限酵素により認識される配列から離れた特定の部位を開裂する制限酵素をいう。

ベクタープライマーの構造の一例を、図 2 D に示す。このベクタープライマーは、例えば、マルチクローニング部位を有するプラスミドを同マルチクローニング部位の二箇所で切断して得られる直鎖状プラスミドと、この直鎖状プラスミドの一方の末端と同じ形の末端を有し、一本鎖のポリ T 配列を有する部分二本鎖 DNA とを連結することにより、調製することができる。図 1 に、マルチクローニング部位を有するプラスミドの例として、MAGE/pUC19 の構造を示す。このプライマーは、基本構造として公知のクローニングベクターである pUC19 を含み、そのマルチクローニングサイトの EcoRI と HindIII 制限酵素部位の間に、種々の制限酵素認識部位を含む配列（Z fragment と呼ぶ。配列を配列番号 1 に示す。）が挿入されたものである。

尚、以下の具体例では、MAGE/pUC19 は、Dam メチレーション系を有するエシェリヒア・コリ宿主、例えば JM109 株等を用いて調製したものを使用する例について説明するが、本発明に必須ではない。また、基本構造となるベクターは、pUC19 に限られるものでなく、それ以外のベクター、例えば pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、RSF1010、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218 等、種々のベクターを用いることができる。尚、用いるベクターの宿主は、形質転換、宿主からのベクターの回収等、通常の遺伝子組換え技術を適用することができるものであれば特に制限されるものではないが、通常、エシェリヒア・コリが用いられる。

以下、マルチクローニング部位を有するプラスミドとして MAGE/pUC19 を用いた例について説明するが、本発明はこれに限られるものではない。

まず、MAGE/pUC19 ベクター（図 2 A）を、制限酵素 BstXI 及び PstI で処理し、切り取られた小断片を除去する（図 2 B）。次に BstXI による切断末端に、一本鎖のポリ T 配列を有する部分二本鎖 DNA（図 2 C に示すポリ T アダプター）を

ライゲーションする。これにより、MAGE/pUC19ベクターの一端から一本鎖のポリ T が飛び出した形のベクタープライマー（又は、逆転写用ベクタープライマー）が形成される（図 2 D）。このベクタープライマーでは、第一の制限酵素は PmeI であり、第二の制限酵素は BglII であり、タイプ IIS 制限酵素は BsgI である。

第二の制限酵素 BglII の認識配列には MboI 認識配列が重複して含まれており、BglII 末端を MboI 末端と連結すると、MboI で切断することができる。また、この例では、ベクタープライマーの第一の制限酵素（PmeI）認識配列のさらに内側に、第四の制限酵素（MboI）認識配列と一塩基異なる塩基配列を含むように設計されている（図 3 E の Δ MboI）。この Δ MboI 及びベクタープライマーの第一の制限酵素認識配列は、ポリ T アダプターに由来する。

第一の制限酵素及び第二の制限酵素は、ベクタープライマーを一箇所ですべて切断するものであれば特に限定されない。また、タイプ IIS 制限酵素及びその存在位置は、ベクタープライマーから第四の制限酵素部位を切除せず、かつ、cDNA の上流側の一部をベクタープライマーに残したまま切断するものであれば特に制限されない。具体的には、例えば上記 BsgI の他に、BsmFI 等が挙げられる。

また、ポリ T 配列の長さは、mRNA のポリ A 配列とアニールできる程度の長さであればよく、通常 10～50 塩基程度である。

上記のようなベクタープライマーと、遺伝子の発現頻度を解析しようとする細胞に由来する mRNA とをアニールさせる。その状態で逆転写反応を行うと、ポリ T がプライマーとなって cDNA 合成が始まる（図 3 E）。そして、合成された一本鎖目の cDNA を鋳型として二本鎖目を合成し、二本鎖 cDNA が合成できる（図 3 F）。多数の mRNA 分子から多数の cDNA が結合したベクタープライマー分子（cDNA-MAGE/pUC19）ができるが、図 3 F はその典型例のひとつを示したものである。

mRNA は、遺伝子の発現頻度を解析しようとする細胞から抽出する。発現頻度を解析しようとする細胞は、動物や植物の組織の細胞、酵母等の微生物の細胞等、細胞中の mRNA の 3' 末端にポリ A 構造を有するものであれば特に制限なく使用することができる。また、原核生物の mRNA は 3' 末端にポリ A（poly(A））構造を持たないために、そのままではベクタープライマーのポリ T にアニールさせることはできないが、mRNA に酵素的にポリ A 構造を付加することにより、真核生物の

mRNAと同様にして本発明の方法を実施することができる。

mRNAの調製、及びcDNA合成、オリゴヌクレオチドの合成、制限酵素反応、ライゲーション反応、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション（PCR）、形質転換等の操作は、通常のcDNAクローニングに用いられるmRNAの調製法（例えばSambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989)等参照）と同様にして行うことができる。

<2>ステップ（b）

次に、前記のようにして得られるcDNAが結合したベクタープライマーを、ベクタープライマーを切断せず、かつ、前記第二の制限酵素の切断末端と同じ形の末端を生じさせる第三の制限酵素と、前記第二の制限酵素とを用いて消化してcDNAの上流側を切除し、ベクタープライマーを閉環させる。閉環されたベクタープライマーは、それを適当な宿主に導入し、得られる形質転換体を培養してプラスミドを回収することにより、増幅させることができる。尚、以降の工程で得られる閉環状のベクタープライマーも同様であるが、回収されたベクタープライマーを切断しようとする制限酵素部位が、Damメチレーションにより切断されない場合には、修飾系を有しない宿主を用いる。

前記第三の制限酵素としては4塩基認識の酵素が好ましい。6塩基認識の酵素であると、cDNA配列中に制限酵素部位が存在しない場合がある。また、ベクタープライマーに残されるcDNAの配列が長いと、後の操作で得られるタグがmRNAのポリA配列から遠くなる。そのような場合、データベース中の遺伝子の発現情報（EST:expressed sequence tag）は、通常mRNAの3'末端側の一部であるため、タグ配列を検索してもヒットしない場合がある。本発明に好適な4塩基認識の制限酵素としては、MboI、TaiI等が挙げられる。

以下、第三の制限酵素として、MboIを用いた例を説明する。まず、cDNAが結合したベクタープライマー（cDNA-MAGE/pUC19）を制限酵素BglII及びMboIで消化する（図3G）。このとき、MAGE/pUC19はDamメチレーションを受けているので、MboIでは切断されず、逆転写により新たに合成されたcDNA中のMboIサイトだけが切断される。図3Gは、仮にcDNAが3箇所のMboIサイトを含む例を示してい

る。cDNAに注目すると、ポリAテールから上流に向かって最初のMboIサイトまでの下流側部分がMAGE/pUC19ベクタープライマーにつながったまま残り、他の部分、すなわちcDNAの上流側はMboI切断により分離除去される。また、MAGE/pUC19は、BglIIIにより一箇所のみが切断される。MboI及びBglIIIで切断された末端は同じ形をしており、ライゲーション反応で互いをつなぐことができる。そこで、これらの末端を介して、cDNA-MAGE/pUC19をセルフライゲーション反応により閉環する(図3H)。

<3>ステップ(c)

ステップ(b)で閉環したベクタープライマーを、前記第一の制限酵素及び前記タイプIIS制限酵素で消化して、cDNAの一部からなるタグを残してcDNAの下流側を切除し、ベクタープライマーを再び閉環する。

具体的には、閉環されたcDNA-MAGE/pUC19を制限酵素BsgI及びPmeIで消化する(図4I)。これらの制限酵素の切断により、cDNAの前記3'末端側部分のうちポリAテールから最も遠い約13塩基のみがベクタープライマーに残る。このcDNAの約13塩基からなる配列を、タグ(図4J中の「tag」で示される)と呼ぶ。

上記のBsgIによる切断点は、5'側が2bp突出しているので、例えばT4 DNAポリメラーゼ処理により平滑化する。また、PmeIによる他方の切断末端は、平滑末端であるので、これらの末端をライゲーションすることができる(図4J)。そこで、ベクタープライマーをセルフライゲーション反応で閉環すると、タグ以外の部分のcDNAが切り取られ、MAGE/pUC19に短いタグがつながった構造のベクタープライマーが得られる(図4J、K)。

<4>ステップ(d)

次に、ステップ(c)で閉環されたベクタープライマーを鋳型とし、ベクタープライマー中のタグの両側のそれぞれの領域に相当する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRを行い、タグを増幅する。

具体的には、タグを含むベクタープライマーを鋳型とし、タグの両側のベクター一部分の配列に相当するプライマー(例えば配列番号2及び3)を用いてPCR反応を行う(図4K)。その結果、中央にタグを含むDNAフラグメント(この場合

はプライマーの配列及びタグを含めて110bp)が増幅される(図4L)。

<5>ステップ(e)

前記のPCR増幅産物を連結してタグのコンカテマーを形成させる。その際、前記(d)のステップで用いるプライマーのうち、タグの下流側のプライマーに、第四の制限酵素切断末端と同じ形の末端を生じさせる第五の制限酵素の認識配列を含ませておき、増幅されたプライマーを第四の制限酵素及び第五の制限酵素で消化すると、効率よくコンカテマーを形成させることができる。第五の制限酵素の種類は特に制限されないが、第四の制限酵素と同じ制限酵素を用いると、操作が簡便となる。また、第四の制限酵素として、第三の制限酵素と同じ制限酵素を用いてもよい。さらに、第三、第四及び第五の制限酵素が同じであってもよい。ただし、第五の制限酵素と第四の制限酵素に同じものを用いる場合は、ステップ(b)でcDNAの全配列がベクタープライマーから切除されてしまうので、それを防ぐために、ベクタープライマーの第一の制限酵素認識配列のさらに内側に、第五の制限酵素認識配列と一塩基異なる塩基配列を含ませておき、タグの下流側に第五の制限酵素認識配列を有するプライマーを用いてPCRを行うことにより、一塩基異なる塩基配列を第五の制限酵素認識配列に変換するようにする必要がある。また、第三の制限酵素と第四の制限酵素が同じである場合には、ベクタープライマーの第四の制限酵素認識部位は、メチレーションにより切断されないようにしておく必要がある。その場合には、第四の制限酵素で消化する前に、ステップ(c)で閉環されたベクタープライマーを修飾系を持たない宿主に導入して脱修飾する。

タグの連結反応を、一方の末端がタグの末端と同じ形を有するアダプター存在下で行い、それによりコンカテマーの両端にアダプターを配置させると、アダプターの配列に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーに用いてPCRを行うことにより、コンカテマーを増幅することができる。アダプターは、タグの量に比べて少量用いるか、一方の末端がタグの末端と異なる形を有するアダプターを用いると、多数のタグからなるコンカテマーの末端にアダプターを配置させることができる。このようにすることで、ごく微量のコンカテマーでもクローニングすることができ、結果としてごく微量のサンプルmRNAを用いた解析が

可能となる。

タグとアダプターの比率は、通常モル比でタグ：アダプター＝1：1～1：0.01、好ましくは1：0.2～1：0.05である。この範囲でアダプターを用いると、タグが2～50程度連結したコンカテマーが得られる。

得られるコンカテマーは、塩基配列決定用のクローニングベクターに挿入すると、シーケンス操作が容易になる。

MAGE/pUC19を用いる場合には、ステップ（d）の増幅産物を制限酵素MboIで消化することにより、タグを含む小断片が得られる（図5M）。ここで得られたタグ断片は、既知のDNA配列、すなわちGATCとAAACGに挟まれており、どの部分がタグかを明確に識別することができる。このタグ配列は両端にMboIサイトが露出しているので、ライゲーション反応によりタグ同士を連結し、コンカテマーを形成させることができる（図5M）。

<6>ステップ（f）

上記のようにして得られるコンカテマーの塩基配列を決定すると、その中には多数のcDNA分子に由来するタグが含まれているので、その塩基配列中に出現するタグの種類及びその頻度を調べることにより、cDNAが由来する遺伝子の発現頻度を解析することができる。タグの種類は、既知のmRNAの部分配列（EST）の情報に関するデータベースを検索することにより調べることができる。

尚、タグのコンカテマーを増幅することにより、同一配列を持つフラグメントが複数個生じることになる。しかし、クローニング後のシーケンス解析において、先にシーケンスしたものと同一物とみなされるシーケンスは出現した場合は、それを解析から除くことにより、遺伝子発現頻度解析にPCRが及ぼす悪影響を排除することができる。

また、第四と第五の制限酵素として同じ酵素を用いた場合は、コンカテマー中のタグの向きは不定であるので、配列解析においては一方の鎖だけでなく逆鎖の配列も考慮する。

以上説明したように、本発明の方法では、SAGE法のようにダイタグを作らず、個々のタグを既知のDNA断片で挟むことにより、タグが他のタグと連続しないようにすることができる。その結果、タグの境界が曖昧になるという問題点が解決

される。また、PCRを複数回行い、試料を増幅することができるので、微量のmRNAからでも解析が可能となる。さらに、ベクタープライマーを用いることにより、ベクターに融合した形のcDNA合成を行うことで、アビジンやビオチンビーズを用いずに解析することができる。

実施例

マウスC57BL/6肝臓 1gから、Invitrogen社製FastTrack 2.0キットを用いてmRNA 35 μ gを抽出した。

得られたmRNA 0.97 μ gを用いて、以下の様にしてMAGE/pUC19を用いて逆転写cDNA合成後、遺伝子発現頻度解析を行った。

MAGE/pUC19ベクター（図2 A）を、制限酵素BstXI及びPstIで処理し、切り取られた小断片を除去した（図2 B）。次にBstXIによる切断末端に、一本鎖のポリT配列を有する部分二本鎖DNA（図2 Cに示すポリTアダプター）をライゲーションした（図2 D）。このベクタープライマーでは、第一の制限酵素はPmeIであり、第二の制限酵素はBglIIであり、タイプIIS制限酵素はBsgIである（図3 E）。

上記ベクタープライマー0.2 μ gと、上記のマウス肝臓由来のmRNA 0.97 μ gとをアニールさせ、cDNA合成を行い、続いて合成された一鎖目のcDNAを鋳型として二鎖目を合成した（図3 F）。そして、得られたcDNAの40分の1に当たる量（mRNA 0.025 μ g相当）を材料に遺伝子発現頻度解析を行った。

尚、別の実験では、4.5mgの微量臨床サンプルから抽出した、0.05 μ gの微量mRNAを実験材料にして、逆転写cDNA合成後、以下と同様にして遺伝子発現頻度解析を実施することに成功している。

次に、前記のようにして得られるcDNAが結合したベクタープライマーを、第二の制限酵素BglII及び第三の制限酵素であるMboIで消化した（図3 G）。次に、cDNA-MAGE/pUC19のMboI末端及びBglII末端をセルフライゲーション反応により連結して閉環させた（図3 H）。

前記の閉環したベクタープライマーをBsgI及びPmeIで消化し、T4 DNAポリメラーゼ処理により平滑化した後、ベクタープライマーを再び閉環させた（図4 I～

K)。この閉環されたベクタープライマーを鋳型とし、ベクタープライマー中のタグの両側のそれぞれの領域に相当する塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（配列番号2及び3）をプライマーとして、酵素AmpliTaq Gold（PE Biosystems社）を用いてPCRを行い、タグを増幅した（図4L）。PCR反応は、変性（95℃、0.3分）、アニーリング及びポリメラーゼによる伸長反応（72℃、1.5分）からなる反応を65サイクル行うことにより行った。その結果、中央にタグを含む110bpのDNAフラグメントが増幅された。

前記のPCR増幅産物をMboIで消化してタグを切り出し、タグ：アダプターが8：1となるように、配列番号4、5に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをアニールさせたアダプターを加えて連結反応を行い、タグのコンカテマーを形成させた（図5M）。このコンカテマーを、配列番号6に示す塩基配列を有するプライマーを用いたPCRにより増幅した。PCR反応は、変性（95℃、0.3分）、アニーリング（40℃、3分）、ポリメラーゼによる伸長反応（72℃、1分）からなる反応を5サイクル行い、引き続き変性（95℃、0.3分）、アニーリング及び伸長反応（72℃、1分）からなる反応を60サイクル行った。増幅産物を制限酵素NotIで消化し、シーケンス用クローニングベクターpKF3のNotI部位に挿入して、塩基配列を決定した。

得られたシーケンスデータ（11000個）から、同一の配列を有するタグをグループ化し、出現頻度順に並べた。頻度上位10番までを表1に示す。この結果から、マウス肝臓組織中で最も発現頻度が高い遺伝子はウリナリ・プロテインI/II遺伝子であることがわかる。以下、発現頻度の高い順に、アルブミン遺伝子、ウリナリ・プロテインIII遺伝子、アルギニノコハク酸合成酵素遺伝子と並んでいる。このように、本発明の方法は、mRNAサンプルが微量であっても、ベクタープライマーを用いることによりcDNAの回収効率が高く、またタグ配列の不明瞭さを除くことが可能であるので、遺伝子発現頻度を高精度で解析することができる。

表 1

タグ（配列番号）	頻度順位	タグの数	遺伝子名
TGCATTCCATC (7)	1	2196	ウリナリ・プロテインI/II
CCTGGTGGAAA (8)	2	1261	アルブミン
TGCTCTCCACC (9)	3	485	ウリナリ・プロテインIII
GGGAAGTACGC (10)	4	383	アルギニノコハク酸合成酵素
ACCTCGGATGA (11)	5	345	フィブリノーゲンA α
TTCCAGGCCCG (12)	6	333	アポリポプロテインE
ACCAGTGTCCG (13)	7	310	マウスEST
TGCATGCCCTG (14)	8	307	フェリチン軽鎖
CACTACAGCAC (15)	9	300	マウスEST
CTGCCAAGTTC (16)	10	226	レチノール結合タンパク質

産業上の利用の可能性

本発明により、遺伝子の発現頻度を、簡便に、確実に、かつ精度よく解析することができる。

本発明の遺伝子発現解析法は、生命科学の研究にとって有用であるが、特に、健康人と病気の人における特定臓器、又は細胞における遺伝子発現の差異を解析する事により、病気の治療法開発や診断法開発に有用である。例えば、健康人の肝臓と肝炎の肝臓の発現遺伝子の違いを本法により解析することにより、肝炎で特異的に発現が増加したり減少したりする遺伝子を見つけることができる。これら遺伝子の肝臓での役割を調べることにより、肝炎治療を目的として、この遺伝子の働きを阻害したり、促進させたりする薬剤を開発することができる。又、遺伝子そのもの、遺伝子構造から設計したアンチセンスオリゴヌクレオチド、あるいは遺伝子を発現させて得た蛋白質等を、肝炎治療に用いることができる。

また、発症のメカニズムが解っていない病気に対しても、本発明の方法を用いれば、治療法を開発できる可能性がある。さらに、本発明の方法により疾患特異的に発現が変動する遺伝子を発見することができれば、治療ばかりでなく、疾患の診断法を開発することも可能となる。

さらに、医療における利用ばかりでなく、全ての真核生物を対象に有用遺伝子を発見する手段ともなる。例えば、ビール生産に適した酵母を変異により育種した場合、親株と変異株の遺伝子発現の変化を本発明の方法で解析し、変異により発現が変化した遺伝子を同定することができる。このようにして得たビール生産にとって有利な遺伝子を総合的に操作することにより、よりよいビール生産酵母を創製することができる。

また、例えば、大腸菌やコリネバクテリウムのようなアミノ酸生産菌の解析を行うことにより、より優れたアミノ酸生産菌を創製することができる。

請求の範囲

1. 以下のステップを含む遺伝子の発現頻度を解析する方法；

(a) 直鎖状のプラスミドベクターの一方の3'末端に一本鎖のポリT配列と、その内側に第一の制限酵素認識配列とを有し、他方の末端近傍に第二の制限酵素認識配列と、さらにその内側にタイプII S制限酵素認識配列とを有するベクタープライマーと、遺伝子の発現頻度を解析しようとする細胞に由来するmRNAとをアニールさせてcDNA合成を行い、cDNAが結合したベクタープライマーを生成するステップと、

(b) 前記cDNAが結合したベクタープライマーを、ベクタープライマーを切断せず、かつ、前記第二の制限酵素の切断末端と同じ形の末端を生じさせる第三の制限酵素と、前記第二の制限酵素とを用いて消化してcDNAの上流側を切除し、ベクタープライマーを閉環するステップと、

(c) 閉環したベクタープライマーを、前記第一の制限酵素及び前記タイプII S制限酵素で消化して、cDNAの一部からなるタグを残してcDNAの下流側を切除し、ベクタープライマーを再び閉環するステップと、

(d) 前記ベクタープライマーを鋳型とし、ベクタープライマー中のタグの両側のそれぞれの領域に相当する塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとしてポリメラーゼ・チェーン・リアクション(PCR)を行い、タグを増幅するステップと、

(e) 前記増幅産物を連結してタグのコンカテマーを形成するステップと、

(f) 前記コンカテマーの塩基配列を決定し、その塩基配列中出现するタグの種類及びその頻度を調べるステップ。

2. 前記ステップ(e)において、連結反応を、一方の末端がタグの末端と同じ形を有するアダプター存在下で行い、それによりコンカテマーの両端にアダプターを配置させ、アダプターの配列に相当する配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーに用い、コンカテマーを鋳型としてPCRを行うことによりコンカテマーを増幅することを特徴とする請求項1記載の方法。

3. 前記ステップ(e)の後に、前記コンカテマーの塩基配列の決定を、塩基配列決定用のクローニングベクターにクローニングして行うことを特徴とす

る請求項 1 又は 2 記載の方法。

4. 前記第三の制限酵素の認識配列が 4 塩基である請求項 1～3 のいずれか一項に記載の方法。

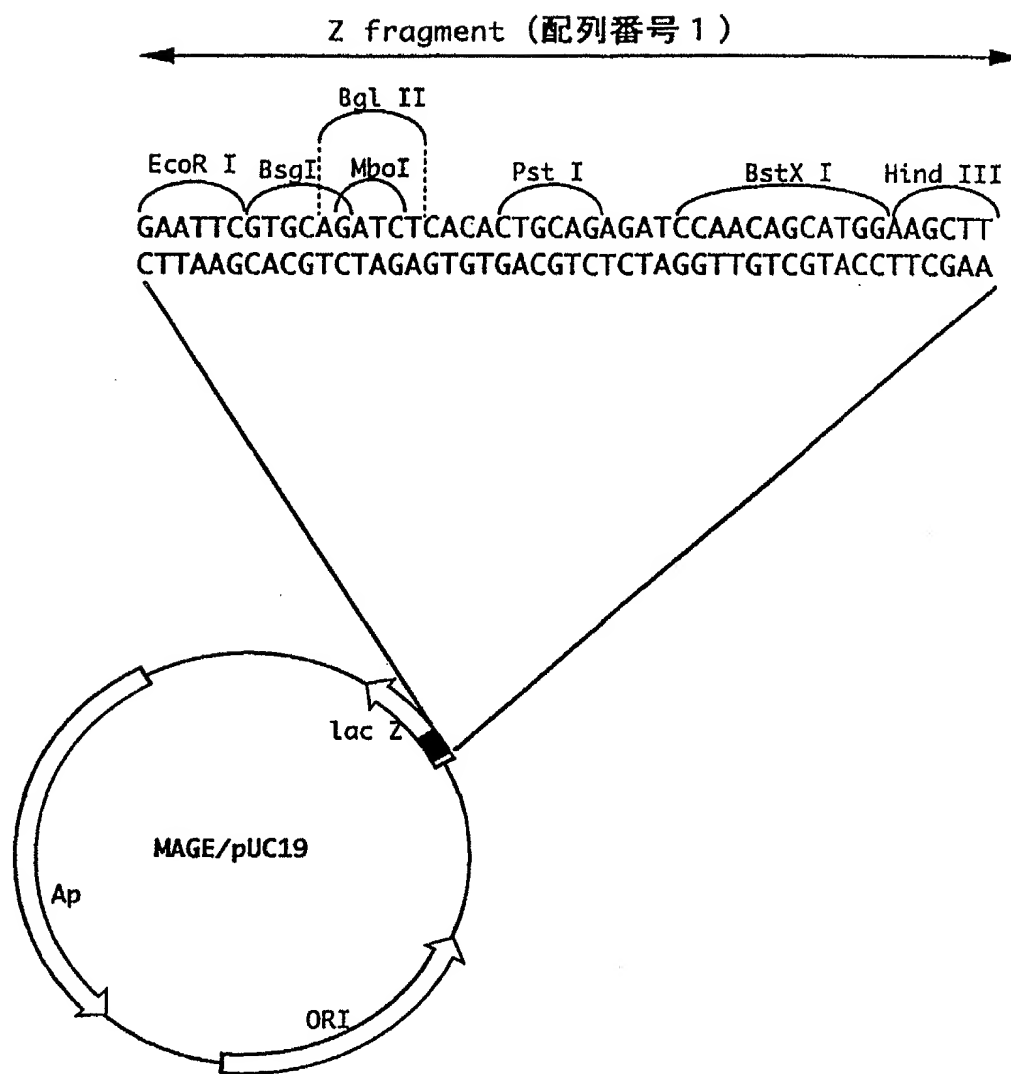
5. ベクタープライマーは、第二の制限酵素認識配列の切断点と同じ位置又はその内側に切断点を有し、かつ、タイプ IIS 制限酵素による切断によってベクタープライマーから切除されない第四の制限酵素認識配列を有し、

前記 (d) のステップで用いるプライマーのうち、タグの下流側のプライマーは、第四の制限酵素切断末端と同じ形の末端を生じさせる第五の制限酵素の認識配列を有し、増幅されたプライマーを第四の制限酵素及び第五の制限酵素で消化した後にコンカテマーを形成させる請求項 1～4 のいずれか一項に記載の方法。

6. 前記ベクタープライマーは、第一の制限酵素認識配列のさらに内側に第五の制限酵素認識配列と一塩基異なる塩基配列を有し、前記タグの下流側のプライマーを用いた PCR により前記一塩基異なる塩基配列が第五の制限酵素認識配列に変換される請求項 5 記載の方法。

7. 前記第三の制限酵素、第四の制限酵素及び第五の制限酵素が同一である請求項 6 記載の方法。

8. ベクタープライマーが、マルチクローニング部位を有するプラスミドを同マルチクローニング部位の二箇所で切断して得られる直鎖状プラスミドと、この直鎖状プラスミドの一方の末端と同じ形の末端を有し、一本鎖のポリ T 配列を有する部分二本鎖 DNA とが連結されたものである請求項 1～7 のいずれか一項に記載の方法。



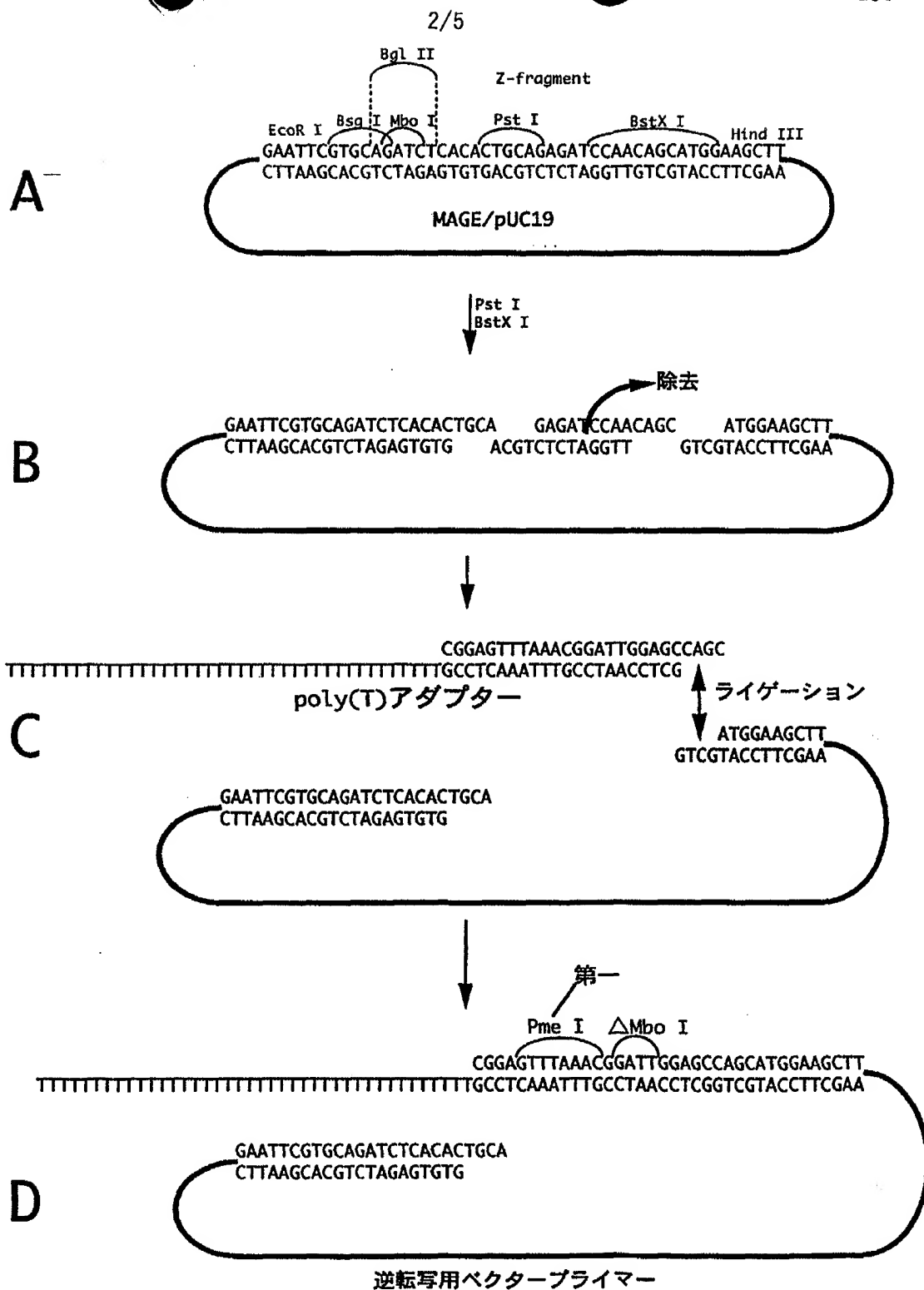


図 5

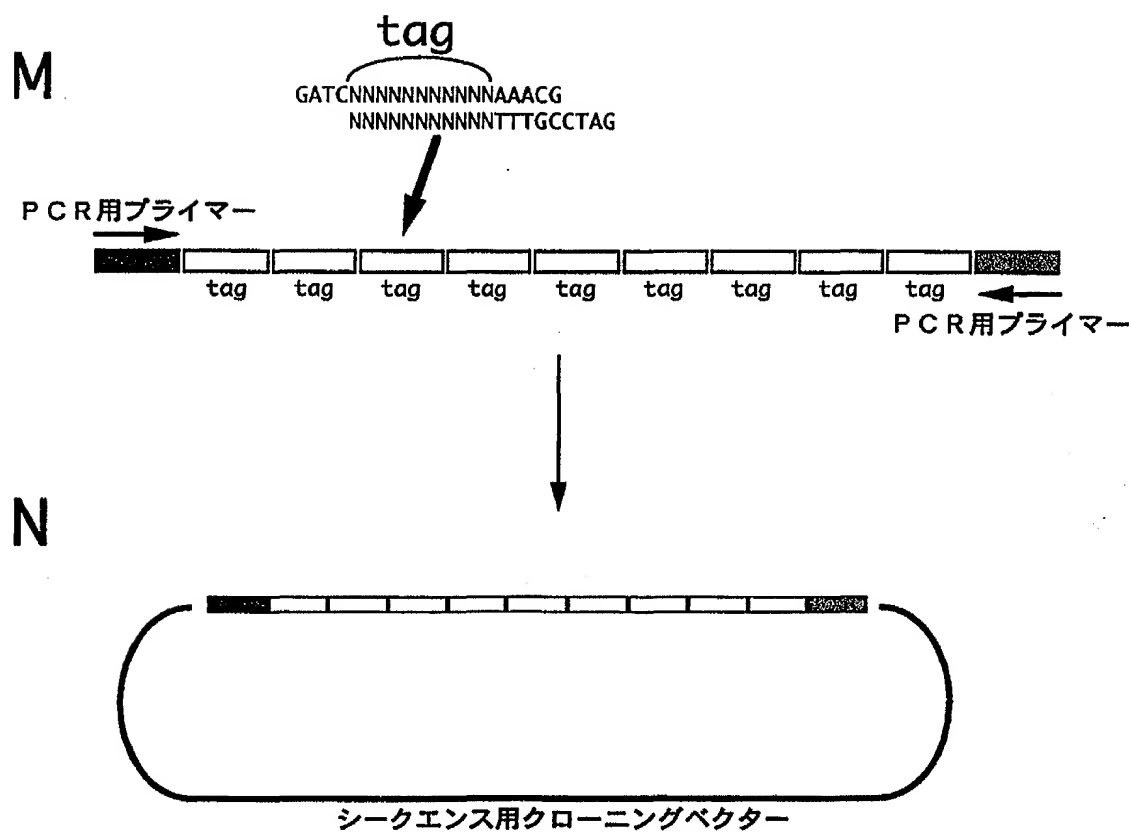


図 5

配列表 (SEQUENCE LISTING)

<110> 味の素株式会社 (Ajimono Co., Inc.)

<120> 遺伝子の発現頻度の解析方法

<130> B-583AYOP962

<150> JP 11-38538

<151> 1999-02-17

<160> 16

<210> 1

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: multi-cloning site

<400> 1

gattcgtgca gatctcacac tgcagagatc caacagcatg gaagctt

47

<210> 2

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<400> 2

acgccagggt tttcccagtc acgacg

26

<210> 3

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer

<210> 8
<211> 11
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 8
cctggtggaa a 11

<210> 9
<211> 11
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 9
tgctctccac c 11

<210> 10
<211> 11
<212> DNA
<213> Mus musculus
<400> 10
gggaagtacg c 11

<210> 11
<211> 11
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 11
acctcgatg a 11

<210> 12
<211> 11
<212> DNA
<213> Mus musculus

<400> 12
ttccagccc g 11

<210> 13
<211> 11
<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 13

accagtgtcg c

11

<210> 14

<211> 11

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 14

tgcattgcct g

11

<210> 15

<211> 11

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 15

cactacagca c

11

<210> 16

<211> 11

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 16

ctgccaagtt c

11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00902

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N 15/10, C12Q 1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N 15/00~90, C12Q 1/00~70, C12N 9/00~99

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Giguere S.et al., "Quantitation of equine cytokine mRNA expression by reverse transcription-competitive polymerase chain reaction", Vet Immunol Immunopathol (Jan.4 1999), Vol.67, No.1, p.1-15	1-8
A	Czarnota GJ.et al., "High resolution microanalysis and three-dimensional nucleosome structure associated with transcribing chromatin", Micron (1997 Dec.), Vol.28, No.6, p.419-431	1-8
PA	Berangere Virolon et al., "Serial microanalysis of renal transcriptomes", Proc.Natl.Acad.Sci.USA (Dec.21 1999), Vol.96, No.26, p.15286-15291	1-8
A	WO, 97/10363, A1 (UNIV.JOHNS HOPKINS SCHOOL MEDICINE), 20 March, 1997 (20.03.97) & EP, 761822, A2 & US, 5695937, A & US, 5866330, A & JP, 10-511002, A	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search
16 May, 2000 (16.05.00)

Date of mailing of the international search report
06.06.00

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PA	Berangere Virolon et al., "Serial microanalysis of renal transcriptomes", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (Dec. 21 1999), Vol. 96, No. 26, p. 15286-15291	1-8
A	WO, 97/10363, A1 (UNIV. JOHNS HOPKINS SCHOOL MEDICINE) 20. 3月. 1997 (20. 03. 97) & EP, 761822, A2 & US, 5695937, A & US, 5866330, A & JP, 10-511002, A	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00902

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N 15/10, C12Q 1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N 15/00-90, C12Q 1/00-70, C12N 9/00-99

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Giguere S. et al., "Quantitation of equine cytokine mRNA expression by reverse transcription-competitive polymerase chain reaction", Vet Immunol Immunopathol (Jan. 4 1999), Vol. 67, No. 1, p. 1-15	1-8
A	Czarnota GJ. et al., "High resolution microanalysis and three-dimensional nucleosome structure associated with transcribing chromatin", Micron (1997 Dec.), Vol. 28, No. 6, p. 419-431	1-8
PA	Berangere Viroton et al., "Serial microanalysis of renal transcriptomes", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (Dec. 21 1999), Vol. 96, No. 26, p. 15286-15291	1-8
A	WO, 97/10363, A1 (UNIV. JOHNS HOPKINS SCHOOL MEDICINE), 20 March, 1997 (20.03.97) & EP, 761822, A2 & US, 5695937, A & US, 5866330, A & JP, 10-511002, A	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
16 May, 2000 (16.05.00)

Date of mailing of the international search report
06.06.00

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/00902

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N 15/10, C12Q 1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N 15/00-90, C12Q 1/00-70, C12N 9/00-99

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Giguere S. et al., "Quantitation of equine cytokine mRNA expression by reverse transcription-competitive polymerase chain reaction", Vet Immunol Immunopathol (Jan. 4 1999), Vol. 67, No. 1, p. 1-15	1-8
A	Czarnota GJ. et al., "High resolution microanalysis and three-dimensional nucleosome structure associated with transcribing chromatin", Micron (1997 Dec.), Vol. 28, No. 6, p. 419-431	1-8
PA	Berangere Virolon et al., "Serial microanalysis of renal transcriptomes", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (Dec. 21 1999), Vol. 96, No. 26, p. 15286-15291	1-8
A	WO, 97/10363, A1 (UNIV. JOHNS HOPKINS SCHOOL MEDICINE), 20 March, 1997 (20.03.97) & EP, 761822, A2 & US, 5695937, A & US, 5866330, A & JP, 10-511002, A	1-8

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 16 May, 2000 (16.05.00)	Date of mailing of the international search report 06.06.00
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.